家蚕非编码 RNA 在神经系统中的表达分析

王立方，乔惠丽，吴　博，张　丹，阚云超，李丹丹*

(南阳师范学院，河南省伏牛山昆虫生物学重点实验室，河南南阳 473061)

摘要：【目的】非编码 RNA(non-coding RNA, ncRNA)在家蚕 *Bombyx mori* 发育过程中具有重要调控作用。本研究旨在探索 ncRNA 参与家蚕神经系统发育的分子机理。【方法】采用实时荧光定量 PCR 技术对 22 个中等长度的 ncRNA 及 3 个 ncRNA 的邻近编码基因在家蚕幼虫神经系统中的表达水平进行检测。【结果】8 个 ncRNA(包括 1 个 C/D box snoRNA,4 个 H/ACA box snoRNA 和 3 个不能归类的 ncRNA)在家蚕 5 龄幼虫神经组织和非神经组织中均有表达,且在胸腹神经中的表达量明显高于头部神经中的表达量。其中,snoRNA Bm-51, Bm-18 和 Bm-86 在胸腹神经中的表达量分别是头部神经中的 23, 5 和 4.7 倍。进一步研究发现,这 3 个内含子起源的 ncRNA 与其宿主基因在家蚕神经系统中的表达趋势一致,宿主基因在胸腹神经中的表达量也明显高于头部神经中的表达量。【结论】本研究筛选到的在家蚕不同神经部位存在差异表达的 ncRNA,特别是在胸腹神经中高表达的 ncRNA 可能协同其邻近编码基因,参与家蚕神经发育或神经活动过程。该结果为研究 ncRNA 参与家蚕神经系统发育提供了分子依据,为从非编码 RNA 角度探索鳞翅目害虫防治提供了新的思路。

关键词：家蚕；神经系统；非编码 RNA；表达谱；胸腹神经

中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2015)08-0926-07

Expression analysis of non-coding RNAs in the nervous system of the silkworm, *Bombyx mori*

WANG Li-Fang, QIAO Hui-Li, WU Bo, ZHANG Dan, KAN Yun-Chao, LI Dan-Dan* (Henan Provincial Key Laboratory of Funiu Mountain Insect Biology, Nanyang Normal University, Nanyang, Henan 473061, China)

Abstract:【Aim】A large number of genomic transcripts in both prokaryotes and eukaryotes are non-protein coding RNAs (ncRNAs). Accumulated evidences show that ncRNAs play important roles during the development of the silkworm, *Bombyx mori*. This study aims to explore the molecular mechanisms of ncRNAs in the nervous development of the silkworm.【Methods】Real-time PCR was used to study the expression of 22 ncRNAs and three neighboring genes of ncRNAs in the nervous system of the silkworm.【Results】Eight ncRNAs including a C/D box snoRNA, four H/ACA box snoRNAs and three unclassified ncRNAs were accumulated much more in the ventral thoracic nerves than in the nerves of head in the 5th instar larvae of the silkworm. Especially, the expression levels of snoRNA Bm-51, Bm-18 and Bm-86 in the ventral thoracic nerves were 23, 5 and 4.7 times as high as those in the nerves of head, respectively. Further studies showed that the expression of host genes was consistent with that of the three intron-origin ncRNAs, with more accumulation in the ventral thoracic nerves than in the nerves of head.【Conclusion】ncRNAs with higher expression in the ventral thoracic nerves might play roles in the activity of nerves through participating in the regulation of their neighboring genes. The results provide a molecular basis for the functional study of ncRNAs in the silkworm, as well as new clues for the lepidopterous pest control.

Key words: *Bombyx mori*; nervous system; non-coding RNAs; expression profiles; ventral thoracic nerves

基金项目：国家自然科学基金项目(31100938, 31172158)

作者简介：王立方，男，1989 年 3 月生，河南南阳人，硕士研究生，研究方向为昆虫分子生物学，E-mail：lfwangxqt@163.com

*通讯作者 Corresponding author, E-mail：lidannytc@126.com

收稿日期 Received：2015-03-20；接受日期 Accepted：2015-05-18

家蚕 *Bombyx mori* 作为鳞翅目的模式昆虫，在动物遗传学、昆虫免疫学、鳞翅目害虫防治、环境监测及人类疾病等研究领域都具有重要价值。家蚕神经系统属于腹神经索型，由中枢神经系统、外周神经系统和交感神经系统构成。幼虫的中枢神经系统由13 对神经节和连接神经节的神经索组成；外周神经系统由上唇神经、触角神经、视神经等头部外周神经和胸腹部外周神经组成；交感神经系统由头部交感神经、咽侧交感神经和胸腹部交感神经组成。神经系统的活动是家蚕视觉、嗅觉、取食、结茧、交配、排泄等生命活动的基础，对家蚕神经系统的研究对于探索家蚕行为及开发新型环保杀虫剂具有重要价值。同时，家蚕神经干细胞的分裂、分化调控机制与脊椎动物甚至人类有很多相似性，对家蚕神经系统的研究对探索人类神经退行性疾病具有重要借鉴意义（Zhang *et al*., 2013）。

近年来，随着越来越多物种基因组测序的完成，人们发现基因组中存在着大量非编码 RNA，它们在细胞分化、个体发育和表观遗传等生命活动中发挥重要调控作用（Vasudevan *et al*., 2007；Russo and Giordano, 2009）。如在分化神经元和成熟神经元中高表达 microRNAs miR-124 可促进轴突生长，参与神经干细胞的自我更新和分化（Yoo *et al*., 2009；Liu *et al*., 2011）；而 miR-92b 具有维持神经干细胞特性的功能（Kapsimali *et al*., 2007）。啮齿类动物中特异表达的长链非编码 RNA（long non-coding RNA, lncRNA）BC1 和灵长类特异表达的 lncRNA BC200 可选择性地定位于突触后神经元树突内，通过阻断转录起始来调节局部蛋白合成，从而影响信号转导和记忆行为的产生（Kondrashov *et al*., 2005）。在人类中，Sox2OT 在中枢神经系统发育过程中具有重要的作用，Sox2OT 是一条包含有 Sox2 基因的 lncRNA，二者转录方向一致，因此 Sox2OT 与 Sox2 之间可能通过直接或间接的相互作用，共同参与 MCOPS3（microphtalmia syndrome 3）综合征等相关疾病临床表型的形成（Amaral *et al*., 2009；Liu *et al*., 2015）过程。另外，一些 ncRNA 可参与人类多种神经退行性疾病的病理进程（Lukiw, 2007；Sethi and Lukiw, 2009）。如在阿尔茨海默病（Alzheimer disease, AD）患者脑内 BACE1-AS 表达水平显著升高，BACE1-AS 是从 BACE1 基因（淀粉蛋白前 β 位分解酶 1）反义链转录出的长链 ncRNA，BACE1-AS 表达水平升高，遮蔽了 BACE1 mRNA 上 miR-485-5p 的结合位点，使 miR-485-5p 抑制 BACE1 的转录后翻译的功能不能实现，导致过多 β-淀粉样蛋白的生成和累积，造成神经细胞的毒性损伤（Faghihi *et al*., 2008）；在人和小鼠脑中特异表达的 snoRNA HBⅡ-52 和 MBⅡ-52，它们可以通过 18 个碱基的反向互补序列结合在五羟色胺受体 5-HT2cR 基因的外显子区域，参与该受体基因的选择性剪切和 RNA 编辑，突变或缺失 HBⅡ-52 将导致人神经退行性疾病普拉德-威利综合症（Prader-Willi syndrome）的发生（Kishore and Stamm, 2006；Doe *et al*., 2009；Kishore *et al*., 2010）。

近年来，对家蚕非编码 RNA 的研究也逐步开展。目前在 miRbase 数据库中收录了家蚕 563 条成熟的 miRNA 序列，对其功能研究也刚刚起步。我们实验室在前期研究中构建了家蚕 50～500 nt RNA cDNA 文库，发现 189 个新的 ncRNA，包括 141 个 snoRNA、6 个 snRNA、3 个 tRNA、1 个 SRP 和 38 个不能归类的 ncRNAs。进一步研究发现，40 个 ncRNA 在家蚕不同发育阶段存在差异表达，尤其在卵和成虫阶段差异较明显（Li *et al*., 2011, 2014）。为进一步探索这些 ncRNA 的功能，本实验对前期筛选到的 40 个差异表达的 ncRNA 在家蚕神经系统中的表达谱进行研究，并结合其邻近基因的表达情况对 ncRNA 功能进行初步探索，为揭示 ncRNA 参与家蚕神经系统发育的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

家蚕品系为大造 P50，由中国农业科学院蚕业研究所李木旺研究员惠赠。

1.2 实验试剂

Trizol RNA 提取试剂（Invitrogen），cDNA 反转录试剂盒（TaKaRa），FastStart Universal SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂（Roche）。

1.3 家蚕饲养及取样方法

饲养温度 25℃，相对湿度 60%，光周期 12L: 12D，用新鲜桑叶饲养。取 5 龄第 3 天家蚕头部神经（50 头家蚕去掉头部外壳后的组织材料）、胸腹神经（100 头家蚕胸腹神经节和神经索）、非神经组织材料（10 头家蚕胸腹部体壁和丝腺），速冻于液氮中。

1.4 总 RNA 提取、cDNA 合成与基因克隆

将家蚕头部神经和胸腹神经材料直接加液氮研磨成细粉，取适量粉末 Trizol 法提取总 RNA。胸腹部体壁和丝腺分别用液氮研磨后 Trizol 法提取总

RNA,然后取等量的 RNA 样品混合后作为非神经组织材料。取家蚕头部神经、胸腹神经、非神经组织总 RNA 各 2 μg,使用反转录试剂盒(TaKaRa)进行 cDNA 的合成。利用表 1 所列引物进行高保真酶扩增 ncRNA(随机引物反转录 cDNA)及宿主基因[Oligo d(T)15 反转录 cDNA]。每个基因扩增时都用无菌双蒸水作为模板单独扩增一管,作为阴性对照。

1.5 Real-time PCR

实时荧光定量 PCR 采用 Roche 公司 FastStart Universal SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒进行。PCR 反应条件为:95℃ 变性 30 s;55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,40 个循环。*U*6 和 *actinA*3 分别为 ncRNA 和编码基因的内参基因。PCR 结果采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$法计算相对表达量高低(*Ct* 为循环阈值,表示每一个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数,$\triangle Ct$ = 目的基因的平均 *Ct* 值 - 内参基因的平均 *Ct* 值,$\triangle\triangle Ct = \triangle Ct_{样本1} - \triangle Ct_{样本2}$)。

表 1 Real-time PCR 所用引物(Li *et al*., 2014)
Table 1 Primer sets used in Real-time PCR (Li *et al*., 2014)

引物名称 Primer name	GenBank 登录号 GenBank accession no.	引物序列(5′→3′) Primer sequence
Bm-18	GU247270	CTAAGTGATGAAATACCGACACATG TGTTTCAGGACACAAAATCGAAT
Bm-51	GU247303	TTCAGTAATTGTGAGAATAACGC ACACCAGGACACCACTGATT
Bm-86	GU247338	TCGAGTATAGAGTCTCTGGC AAGAATGTACCCTTAACCC
Bm-100	GU247352	GGAAATTATTGGGCCTTGG AGGAGGGCAAATCGCTTC
Bm-101	GU247353	TCATTTCTATAGTAAGCTCTTACCG CTACCATCGCCAGCACTCAC
Bm-135	GU247387	TATGATTATTCTGAGGTCCG AAATCATACAGAGAGGATTT
Bm-159	GU247409	GACACTCAGACCAAATCACG AAAGACCGCAGCACAAACGC
Bm-163	GU247413	CTTGAGACATGAGGTTTGAA AATGAAGGTTTCGTACATGC
RpL5	NM_001043543	ATGGGATTCGTTAAAGTTGT TGTGCCAGTGTATAAGGTGT
SF3B3	XM_004933578	CTCTACAATTTAACACTGCAAGG TGCACCAATCATAACAGCTC
eIF5A	NM_001044073	ATGGGTGACATCGAAGACAC GCCATCATCCGAGATATCAG
U6	AY649381	CTAAAATTGGAACGATACAG ATTTTGCGTGTCATCCTT
actinA3	BMU49854	ATGTGCGACGAAGAAGTTGC TCTGTTGGCCTTGGGGTT

2 结果

2.1 家蚕 ncRNA 的 RT-PCR 扩增结果

提取家蚕神经组织 RNA,对实验室前期得到的 40 个差异表达的 ncRNA 在家蚕神经系统中的表达情况进行分析。利用 Li 等(2014)之前设计成功的 22 对引物对 ncRNA 进行扩增,结果得到 8 个 ncRNA(Bm-18, Bm-51, Bm-86, Bm-100, Bm-101, Bm-135, Bm-159 和 Bm-163)有单一扩增条带,无引物二聚体污染(图 1),其中 5 个扩增结果不单一或有引物二聚体污染,其余 9 个无扩增结果。

2.2 ncRNA 在家蚕神经系统中的差异表达

为了获得 ncRNA 在家蚕神经系统的表达情况,我们选取家蚕 5 龄幼虫第 3 天的头部神经、胸腹神经和非神经组织(胸腹体壁、丝腺)总 RNA 为研究对象,采用实时荧光定量 PCR 检测 8 个 ncRNA 在不同组织中的表达水平。结果如图 2 所示,8 个 ncRNA 在 5 龄第 3 天的幼虫头部神经、胸腹神经和非神经组织中均有表达,且在胸腹神经中的表达量高于头部神经和非神经组织。其中,Bm-51 在胸腹神经表达量是头部神经中表达量的 23 倍,Bm-18 在胸腹神经表达量是头部神经中表达量的 5 倍,Bm-86 在胸腹神经表达量是头部神经中表达量的 4.7 倍,Bm-101 和 Bm-163 在胸腹神经中的表达量分别是头部神经中表达量的 3.4 倍和 3.5 倍。

8 个在胸腹神经中高表达的 ncRNA 包括 1 个 C/D box snoRNA(Bm-18),4 个 H/ACA box snoRNA(Bm-51, Bm-86, Bm-100 和 Bm-101)和 3 个不能归类的 ncRNA(Bm-135, Bm-159 和 Bm-163)。snoRNA 一般靶向指导核糖体 RNA 的甲基化和假尿嘧啶化修饰,但我们发现,在家蚕中枢神经系统差异表达的 5 个 snoRNA 虽然具有典型的 box 结构特征,但均缺乏与 rRNA、snRNA 或其他 RNA 互补的序列元件,为孤儿 snoRNA(orphan snoRNA)。

2.3 3 个内含子起源 ncRNA 的宿主基因 RT-PCR 扩增结果

为了进一步探索这些 ncRNA 的功能,对 ncRNA 上下游编码序列进行分析,选取了 3 个内含子起源的 snoRNA Bm-18, Bm-51 和 Bm-86 作为进一步研究对象。3 个 snoRNA 与宿主基因的 ORF 在基因组上的位置关系如图 3 所示,Bm-18 位于 ribosomal protein L5 基因(*RpL*5)ORF 的第 1 个内含子区,Bm-51 位于 splicing factor 3B subunit 3 基因(*SF3B*3)ORF

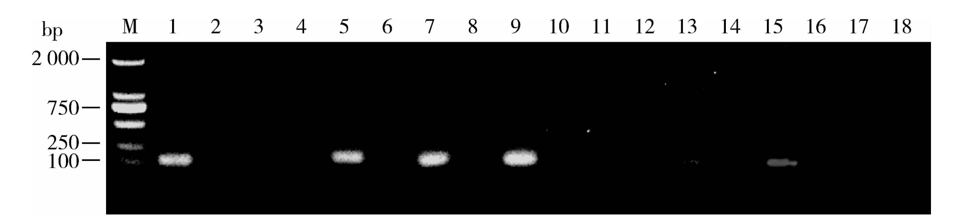


图 1　家蚕 5 龄第 3 天幼虫神经组织中 8 个 ncRNA RT-PCR 电泳结果

Fig. 1　Amplification results of 8 ncRNAs in the nerves of the 5th instar day-3 larvae of *Bombyx mori*

M：DNA 分子量标准物 DL2000 marker；1，3，5，7，9，11，13，15：分别为 Bm-18，Bm-51，Bm-86，Bm-100，Bm-101，Bm-135，Bm-159 和 Bm-163 以及内参 *U6* Bm-18，Bm-51，Bm-86，Bm-100，Bm-101，Bm-135，Bm-159 and the internal control *U6*，respectively；2，4，6，8，10，12，14，16：分别为 Bm-18，Bm-51，Bm-86，Bm-100，Bm-101，Bm-135，Bm-159 和 Bm-163 以及内参 *U6* 的阴性对照 Negative controls of Bm-18，Bm-51，Bm-86，Bm-100，Bm-101，Bm-135，Bm-159 and *U6*，respectively.

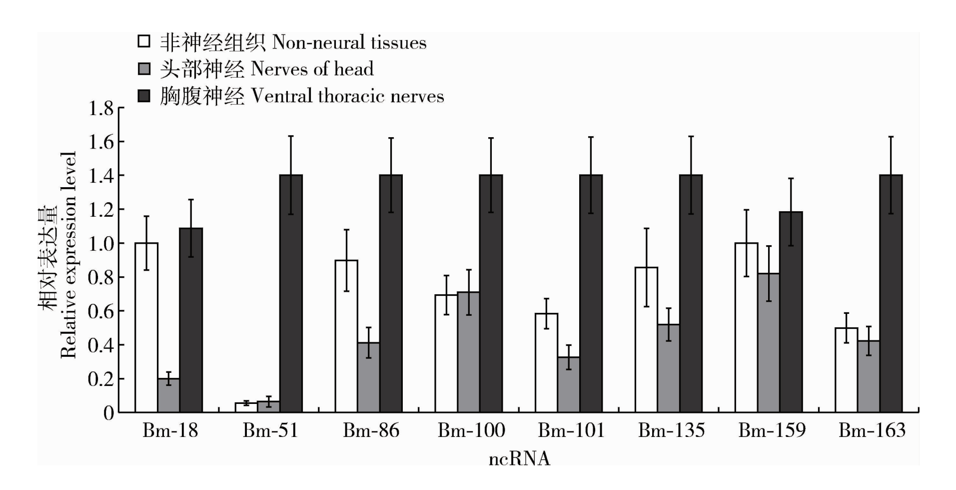


图 2　ncRNA 在家蚕 5 龄第 3 天幼虫非神经组织、头部神经和胸腹神经中的表达情况

Fig. 2　Expression profiles of ncRNAs in the non-neural tissues, the nerves of head and ventral thoracic nerves of the 5th instar day-3 larvae of *Bombyx mori*

U6 为内参基因。*U6* was used as an internal control.

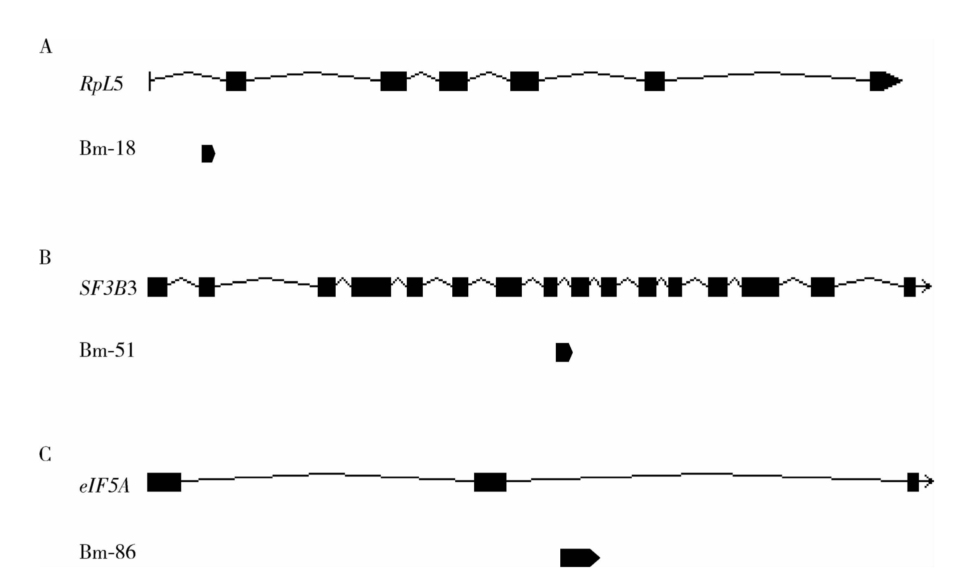


图 3　家蚕 5 龄第 3 天幼虫中 3 个 snoRNA 与宿主基因的 ORF 在基因组上的位置关系图

Fig. 3　Genome location of 3 snoRNAs and the ORFs of their host genes in the 5th instar day-3 larvae of *Bombyx mori*

的第 8 个内含子区，Bm-86 位于 translation initiation factor 5A 基因（*eIF5A*）ORF 的第 2 个内含子区。

RT-PCR 扩增 3 个 snoRNA 的宿主基因，结果如图 4 所示，宿主基因扩增结果良好，无引物二聚体污染。

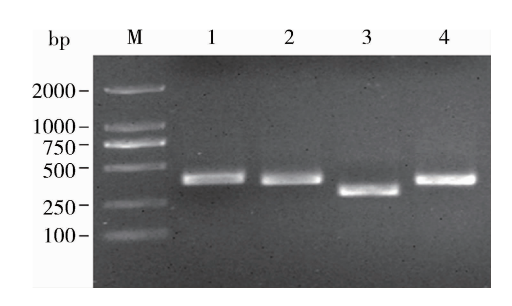


图4 家蚕5龄第3天幼虫中3个snoRNA宿主基因RT-PCR扩增结果

Fig. 4 Amplification results of host genes of 3 snoRNAs in the 5th instar day-3 larvae of *Bombyx mori*

M: DNA 分子量标准物 DL2000 marker; 1 -4: 分别为 Bm-51, Bm-18 和 Bm-86 的宿主基因 *SF3B3*, *RpL5* 和 *eIF5A* 以及内参 *actinA3* 扩增结果 Amplification results of host genes of Bm-51, Bm-18, Bm-86 (*SF3B3*, *RpL5* and *eIF5A*, respectively) and the internal control *actinA3*, respectively.

2.4 3个内含子起源ncRNA的宿主基因在家蚕神经系统中的差异表达

进一步采用实时荧光定量PCR检测3个snoRNA的宿主基因在家蚕神经系统的表达情况，结果如图5所示，Bm-18，Bm-51和Bm-86的宿主基因*RpL5*，*SF3B3*和*eIF5A*在家蚕5龄第3天的头部神经、胸腹神经和非神经组织均有表达，且在胸腹神经的表达量高于头部神经和非神经组织，这与对应的snoRNA的表达情况一致，表明这3个snoRNA可能由其对应宿主基因的内含子剪接产生，对ncRNA具体的功能解析还需要更多的试验证据。

3 讨论

神经系统的调节是家蚕生命活动的基础。中枢

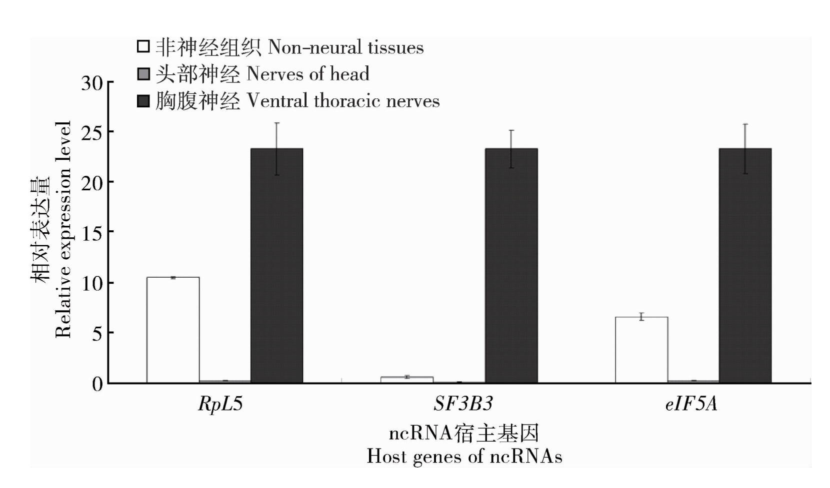


图5 ncRNA宿主基因在家蚕5龄第3天幼虫非神经组织、头部神经和胸腹神经中的表达情况

Fig. 5 Expression profiles of host genes of ncRNAs in the non-neural tissues, the nerves of head and ventral thoracic nerves in the 5th instar day-3 larvae of *Bombyx mori*

RpL5, *SF3B3* 和 *eIF5A* 分别为 Bm-18, Bm-51 和 Bm-86 的宿主基因；*actinA3* 为内参基因。*RpL5*, *SF3B3* and *eIF5A* were the host genes of Bm-18, Bm-51 and Bm-86, respectively. *ActinA3* was used as an internal control.

神经是感觉和运动的协调中心，包括大脑、咽下神经节和胸腹神经节，大脑控制其他神经节的活动，并通过激素和神经连锁两种方法调节眠性和滞育性；胸腹部神经节除受大脑控制外，也有相对的自主性，每一环节内的神经节是本节内的运动中心，支配本环节肌肉的一般反应，另外还控制着吐丝结茧、产卵、排泄等活动。本研究发现家蚕中8个ncRNA在幼虫胸腹神经的表达量明显高于头部神经，表明这些ncRNA可能参与胸腹神经的发育或功能实现。进一步研究发现，8个在胸腹神经高表达的ncRNA中有5个snoRNA为孤儿snoRNA。研究表明，在植物(Marker *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003)、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (Yuan *et al.*, 2003)、小鼠 *Mus musculus* (Huttenhofer *et al.*, 2001)、人 *Homo sapiens* (Cao *et al.*, 2006)和鸡 *Gallus gallus* (Zhang *et al.*, 2009)中均存在这种具有组织或者时期特异性表达的孤儿snoRNA。如在人和小鼠脑中特异表达的snoRNA HBⅡ-52和MBⅡ-52可参与5-HT2cR基因的选择性剪切和RNA编辑，与普拉德-威利综合症发生密切相关(Kishore and Stamm, 2006; Doe *et al.*, 2009; Kishore *et al.*, 2010)。我们发现的这些在胸腹神经中高表达的snoRNA也属于孤儿snoRNA，表明它们在家蚕发育过程中可能发挥着调控功能。

内含子区转录的 ncRNA 通过影响其宿主基因的选择性剪切参与宿主基因的转录或翻译调控(Ciarlo *et al.*, 2013)。我们在研究中发现,3 个内含子起源的 snoRNA 与其宿主基因在神经组织的表达情况一致。Bm-18 的宿主基因 *RpL5* 编码核糖体蛋白 L5,主要参与蛋白质合成过程;Bm-86 的宿主基因 *eIF5A* 编码翻译起始因子 5A,主要参与蛋白质翻译过程,Bm-18 和 Bm-86 与其宿主基因在家蚕神经系统的表达趋势一致,表明 Bm-18 和 Bm-86 可能协同其宿主基因参与蛋白质合成过程。Bm-51 宿主基因 *SF3B3* 产物为 DNA 结合蛋白,主要参与 mRNA 剪切,纺锤体组装过程,表明 Bm-51 可能协同其宿主基因参与 RNA 剪接或纺锤体组装过程。

本研究利用荧光定量 PCR 技术,对 8 个 ncRNA 及邻近基因在家蚕神经组织的表达谱进行研究,结果显示:8 个 ncRNA 在家蚕 5 龄幼虫胸腹神经中的表达量明显高于头部神经,其中 3 个内含子起源的 ncRNA 与其宿主基因在家蚕神经系统中的表达趋势一致。Bm-18 和 Bm-86 可能协同其宿主基因参与蛋白质合成,Bm-51 可能协同其宿主基因参与 RNA 剪接过程。该结果为研究 ncRNA 参与家蚕神经系统发育提供了前期基础。

参考文献(References)

Amaral PP, Neyt C, Wilkins SJ, Askarian-Amiri ME, Sunkin SM, Perkins AC, Mattick JS, 2009. Complex architecture and regulated expression of the *Sox2ot* locus during vertebrate development. *RNA*, 15: 2013 - 2027.

Cao X, Yeo G, Muotri AR, Kuwabara T, Gage FH, 2006. Noncoding RNAs in the mammalian central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.*, 29: 77 - 103.

Chen CL, Liang D, Zhou H, Zhuo M, Chen YQ, Qu LH, 2003. The high diversity of snoRNAs in plants: identification and comparative study of 120 snoRNA genes from *Oryza sativa*. *Nucleic Acids Res.*, 31: 2601 - 2613.

Ciarlo E, Massone S, Penna I, Nizzari M, Gigoni A, Dieci G, Russo C, Florio T, Cancedda R, Pagano A, 2013. An intronic ncRNA-dependent regulation of SORL1 expression affecting Aβ formation is upregulated in post-mortem Alzheimer's disease brain samples. *Dis. Model. Mech.*, 6(2): 424 - 433.

Doe CM, Relkovic D, Garfield AS, Dalley JW, Theobald DEH, Humby T, Wilkinson LS, Isles AR, 2009. Loss of the imprinted snoRNA *mbii*-52 leads to increased *5htr2c* pre-RNA editing and altered $5HT_{2C}$R-mediated behaviour. *Hum. Mol. Genet.*, 18: 2140 - 2148.

Faghihi MA, Modarresi F, Khalil AM, Wood DE, Sahagan BG, Morgan TE, Finch CE, St Laurent G 3rd, Kenny PJ, Wahlestedt C, 2008. Expressionof a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forwa regulation of β-secretase. *Nat. Med.*, 14: 723 - 730.

Huttenhofer A, Kiefmann M, Meier-Ewert S, O'Brien J, Lehrach H, Bachellerie JP, Brosius J, 2001. RNomics: an experimental approach that identifies 201 candidates for novel, small, non-messenger RNAs in mouse. *EMBO J.*, 20: 2943 - 2953.

Kapsimali M, Kloosterman WP, de Bruijn E, Rosa F, Plasterk RH, Wilson SW, 2007. MicroRNAs show a wide diversity of expression profiles in the developing and mature central nervous system. *Genome Biol.*, 8(8): R173.

Kishore S, Khanna A, Zhang Z, Hui J, Balwierz PJ, Stefan M, Beach C, Nicholls RD, Zavolan M, Stamm S, 2010. The snoRNA MBII-52 (SNORD 115) is processed into smaller RNAs and regulates alternative splicing. *Hum. Mol. Genet.*, 19: 1153 - 1164.

Kishore S, Stamm S, 2006. The snoRNA HBII-52 regulates alternative splicing of the serotonin receptor 2C. *Science*, 311: 230 - 232.

Kondrashov AV, Kiefmann M, Ebnet K, Khanam T, Muddashetty RS, Brosius J, 2005. Inhibitory effect of naked neural BC1 RNA or BC200 RNA on eukaryotic in vitro translation systems is reversed by poly(A)-binding protein (PABP). *J. Mol. Biol.*, 353(1): 88 - 103.

Li DD, Liu ZC, Huang L, Jiang QL, Zhang K, Qiao HL, Jiao ZJ, Yao LG, Liu RY, Kan YC, 2014. The expression analysis of silk gland-enriched intermediate-size non-coding RNAs in silkworm *Bombyx mori*. *Insect Sci.*, 21(4): 429 - 438.

Li DD, Wang YH, Zhang K, Jiao Z, Zhu X, Skogerboe G, Guo X, Chinnusamy V, Bi L, Huang Y, Dong S, Chen R, Kan Y, 2011. Experimental RNomics and genomic comparative analysis reveal a large group of species-specific small non-message RNAs in the silkworm *Bombyx mori*. *Nucleic Acids Res.*, 39(9): 3792 - 3805.

Liu C, Rong LM, Liu B, 2015. Sox2 induce mouse embryonic fibroblasts direct reprogramming into neural stem cells. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 31(1): 87 - 92. [刘畅, 戎利民, 刘斌, 2015. Sox2 诱导小鼠胚胎成纤维细胞直接重编程为神经干细胞. 中国病理生理杂志, 31(1): 87 - 92]

Liu XS, Chopp M, Zhang RL, Tao T, Wang XL, Kassis H, Hozeska-Solgot A, Zhang L, Chen C, Zhang ZG, 2011. MicroRNA profiling in subventricular zone after stroke: MiR-124a regulates proliferation of neural progenitor cells through Notch signaling pathway. *PLoS ONE*, 6(8): e23461.

Lukiw WJ, 2007. Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus. *Neuroreport*, 3: 297 - 300

Marker C, Zemann A, Terhorst T, Kiefmann M, Kastenmayer JP, Green P, Bachellerie JP, Brosius J, Hüttenhofer A, 2002. Experimental RNomics: identification of 140 candidates for small non-messenger RNAs in the plant *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Biol.*, 12: 2002 - 2013.

Russo G, Giordano A, 2009. miRNAs: from biogenesis to networks. *Methods Mol. Biol.*, 563: 303 - 352.

Sethi P, Lukiw WJ, 2009. Micro-RNA abundance and stability in human brain: specific alterations in Alzheimer's disease temporal lobe neocortex. *Neurosci. Lett.*, 2: 100 - 104.

Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA, 2007. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*, 5858:

1931 – 1934.

Yoo AS, Staahl BT, Chen L, Crabtree GR, 2009. MicroRNA-mediated switching of chromatin-remodelling complexes in neural development. *Nature*, 460(7255): 642 – 646.

Yuan G, Klambt C, Bachellerie JP, Brosius J, Huttenhofer A, 2003. RNomics in *Drosophila melanogaster*: identification of 66 candidates for novel non-messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.*, 31: 2495 – 2507.

Zhang Y, Lu ZY, Yang JZ, Li FF, Rong Y, Zhao P, Xia QY, 2013. Homologous gene analysis of human neurodegenerative disease related genes in silkworm *Bombyx mori*. *Science of Sericulture*, 39(6): 1090 – 1103. [张毅, 卢忠燕, 杨举泽, 李飞帆, 戎妍, 赵萍, 夏庆友, 2013. 神经退行性疾病关联基因的家蚕同源基因预测分析. 蚕业科学, 39(6): 1090 – 1103]

Zhang Y, Wang J, Huang S, Zhu X, Liu J, Yang N, Song D, Wu R, Deng W, Skogerbø G, Wang XJ, Chen R, Zhu D, 2009. Systematic identification and characterization of chicken (*Gallus gallus*) ncRNAs. *Nucleic Acids Res.*, 37: 6562 – 6574.

(责任编辑: 袁德成)